

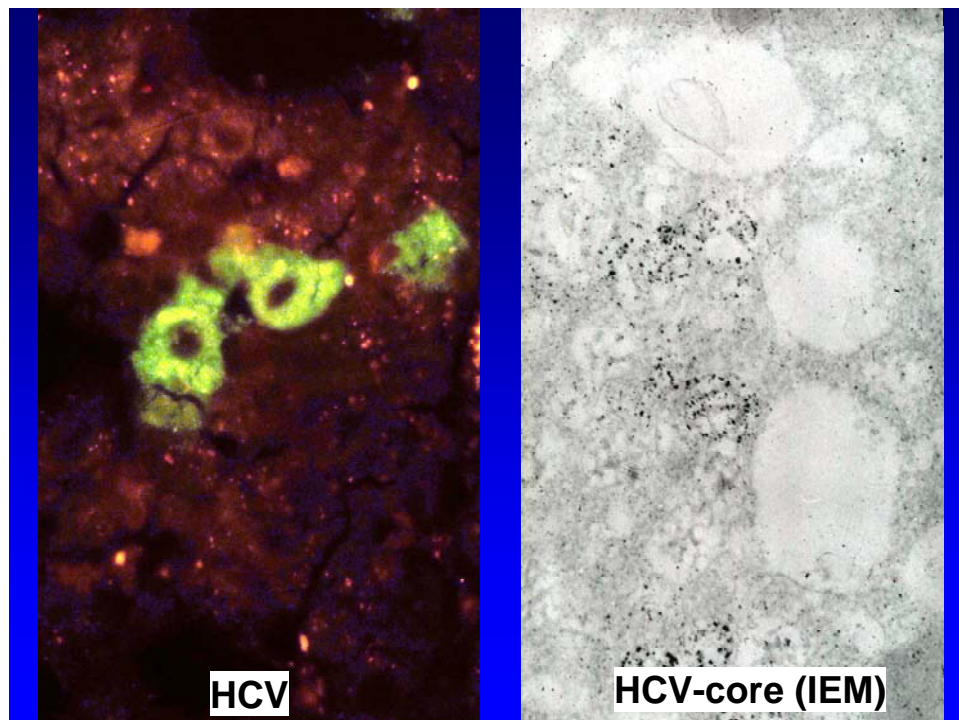
1. A kutatás célja

a hepatitis vírusok, elsősorban a hepatitis C vírus (HCV) okozta krónikus májbetegség egyes formái kialakulásának és progressziójának a vizsgálata volt. A folyamatot a vírus sajátosságainak, egyes növekedési faktorok és adhéziónak molekulák kölcsönhatásaival kívántuk nyomon követni. Célként a progresszió fenntartásában szerepet játszó tényezők, így az apoptózis, proliferáció, az extracelluláris matrix egyes komponensei, adhéziónak molekulák stb, valamint virális antigének expresszióját kívántuk vizsgálni egymással összefüggésben. Kiemelten terveztük a sejtheadhézió egyes molekuláinak, valamint a fibrogenesis folyamatának a tanulmányozását.

2. Módszerek

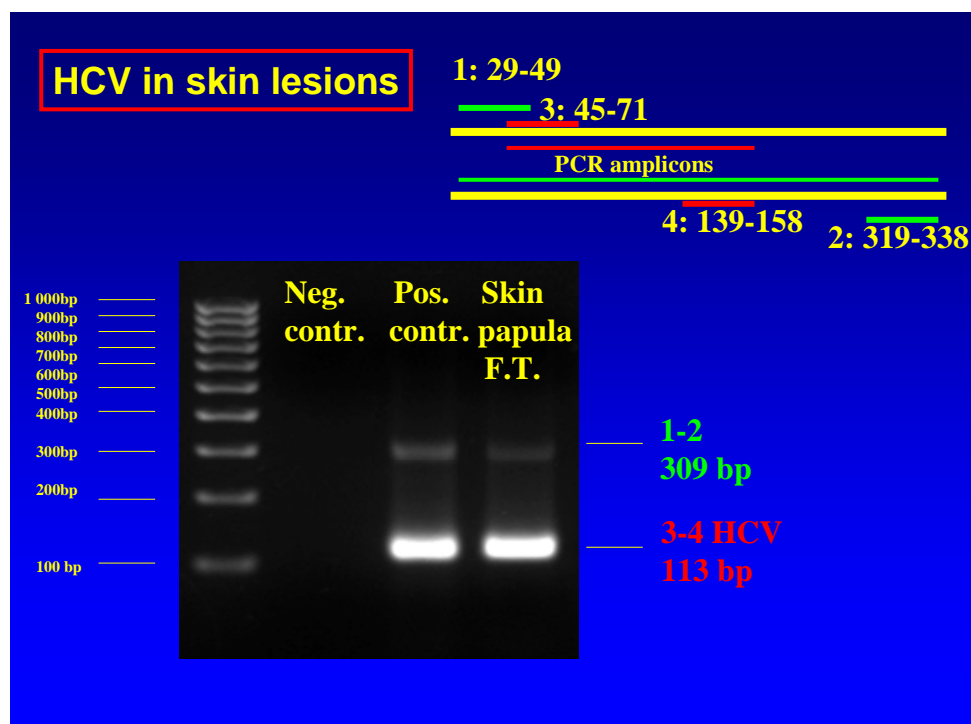
Munkánk során a fenti feladatok elvégzéséhez a következő módszereket állítottuk be, illetve standardizáltuk;

2.1. A HCV egyes komponenseit, különösen a core-komponens lokalizációját korábbi munkáink alapján határoztuk meg. Korábbi megfigyeléseink szerint igazoltuk, hogy a HCV core részben az endoplazmatikus retikulumban, másrészt a perinukleáris régióban lokalizálódik (1. ábra).



1. ábra

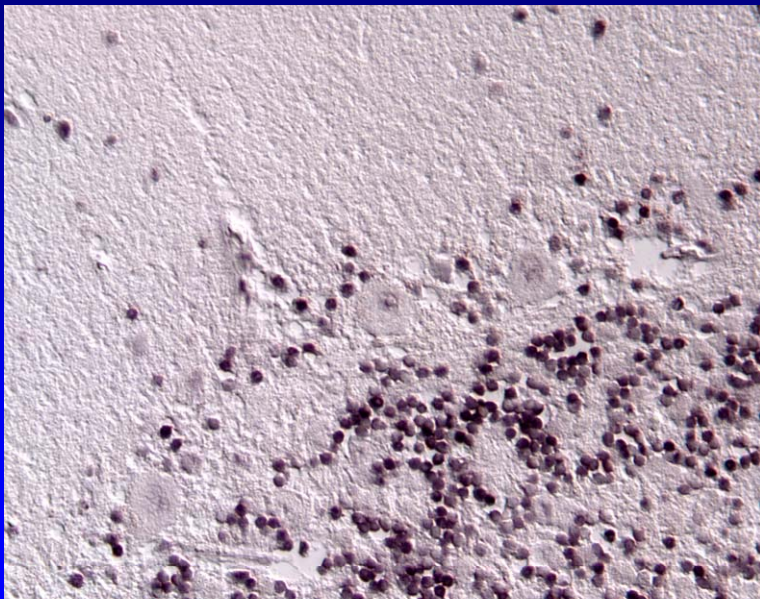
2.2. Módszert dolgoztunk ki, illetve a közölt módszert némileg módosítva alkalmaztuk a HCV detektálását fixált, paraffinba ágyazott anyagból. Ezen módszerrel a HCV extrahepatikus manifestációi közül sikerült kimutatnunk a HCV-t a bőr léziókban (2. ábra).



2. ábra

2.3. In situ hibridizációs módszer segítségével HCV fertőzött csimpánz máj- illetve agyszövetében igazoltuk, hogy a HCV a csimpánz cerebellum glia sejtjeiben is megjelenik. Ezen vizsgálatokat a Hans Popper Primate Centerből nyert fagyasztott mintákon, valamint paraffinba ágyazott mintákon végeztük (3. ábra).

HCV by in situ hybridization in cerebellum



3. ábra

2.4. A különböző fixáló szerek hatását tekintve metodikai vizsgálatokat végeztünk az RNS integritásának megőrzésére. Ezen munka más projekt keretében került publikálásra (Páska Cs. et al: Effect of formalin, acetone and RNAlater fixatives on tissue preservation and different size amplicons by real-time PCR from paraffin-embedded tissue. Diagn Mol Pathol 13: 234-240, 2004). Ezen munka alapján egyértelműen igazoltuk, hogy az RNA laterben történt fixálás kitűnő RNS izolálási lehetőséget és strukturális megőrzöttséget biztosít, mely egyenértékű a fagyasztott anyagból történő izolálással.

Kimutattuk azonban, hogy megfelelően puffertolt formalinban történt azonnali fixálás után az RNS minősége megfelelő és 100 bázispár hosszúságú primerrel még biztonságosan kimutatható májszövetben is.

2.5. Számos primer ellenanyagot használva lokalizáltuk a vizsgált antigéneket paraffinos és fagyasztott anyagban. A vizsgálatokat részben manuálisan, részben immunautomata segítségével végeztük, különböző detektáló módszereket használva; így peroxidáz, immunfluoreszcencia, konfokális lézer scanning mikroszkópia és kettős jelölés módszerével.

- 2.6. A hagyományos PCR technikák mellett Real-Time PCR-t alkalmaztunk.
- 2.7. A fehérje expressziót egyes esetekben Western blot technikával is vizsgáltuk.
- 2.8. A vizsgálatokhoz – esetenként változó – statisztikai módszereket alkalmaztunk.

3. Eredmények és azok értékelése

- 3.1. Több antitesttel végeztünk vizsgálatokat az egyes HCV antigének, kiemelten a core antigén detektálására paraffinos anyagban. Azon korábbi feltevésünk, hogy az HCV core antigénjének megjelenése alapján – a HBV-hez hasonlóan – esetleges jellegzetes expressziós csoportok alkothatók, nem bizonyult igazolhatónak.

- 3.2. Eredményesnek bizonyultak azon vizsgálataink, amelyek a steatosis és a krónikus hepatitis C összefüggését vizsgálták.

Ismertes, hogy a krónikus hepatitis C (mint egyéb hepatitis) fokozata, illetve stádiuma elkülöníthető, és ezt elsősorban a gyulladás sejtek aránya, a necroinflammatio mértéke, illetve a fibrosis és szerkezeti torzulás szabja meg. A korábbi értékelésekben a steatosisnak külön jelentőséget nem tulajdonítottak. Munkánk során a steatosis fokozatát májbiopsziás mintákban állapítottuk meg, melyet összefüggésbe hoztuk a szérum alanin aminosztransferáz (ALT), az össz koleszterin és a triglicerid szinttel 142 krónikus hepatitis C-ben szenvedő betegben, 28 nem alkoholos zsírmájban szenvedő betegben (HCV negatív), a biopsziás anyag értékelése alapján.

Mindezen szérum paramétereket 1797 kor és nem szerint egyeztetett kontroll beteg adataival hasonlítottuk össze, akik nem szenvedtek májbetegségben.

Megállapítottuk, hogy a steatosis a 142 betegből 90-ben (63%) volt jelen annak ellenére, hogy a betegek HCV1b típusba tartoztak. Az ALT szint korrelált a steatosis fokozatával mind a krónikus hepatitis C, mind a nem alkoholos zsírmáj (NAFLD) ($p<0,01$) esetében. Amennyiben a steatosis pontértékét, mint a hisztológiai aktivitási index érték részét tekintettük, az korrelált az ALT szinttel ($p<0,0001$). Meglepő eredményként találtuk, hogy a triglicerid és a koleszterinszint szignifikánsan alacsonyabb volt a steatosisal

és steatosis nélkül járó krónikus hepatitis C-s betegekben, összehasonlítva azokat a vírusmentes NAFLD csoporttal (4. ábra).

	Male			Female			Total	Sum total
	<44 yr	>45 yr	total	<44 yr	>45 yr	total		
HCV-infection:								
with steatosis	29	15	44	26	20	46	90	
without steatosis	24	11	45	10	7	17	52	
								142
no HCV-infection								
NAFLD	10	6	16	5	7	12	28	
								28
no liver disease:								
non alcoholic	60	509	569	125	803	928	1497	
alcoholic	86	190	276	8	16	24	300	
								1797

4. ábra

Fenti tanulmányunk a HCV core protein korábbi munkánkban igazolt, steatosis-indukáló hatásának jelentőségét igazolta a májbetegség értékelésében, és a progresszió megállapításában.

3.3. A CD81 HCV receptor expressziójának vizsgálata

A CD81 HCV receptor jelentősége diszkusszió tárgya, és az utóbbi években primer szerepe megkérdőjeleződött a HCV életciklusában. Változatlanul elfogadható, hogy szerepe van a HCV sejtfelszínhez való kötődésében, azonban úgy tűnik, hogy az internalizációban kisebb jelentőségű. Korábbi munkáinkban és ezen vizsgálati periódus alatt is detektáltuk a CD81-t HCV fertőzést követően. Míg korábbi kísérletes munkáinkban a csimpánz májakon igazolni tudtuk, hogy a HCV fertőzés után jelentősen megnövekszik a CD81 expresszió a hepatocyták felszínén, ugyanezen jelenséget az emberi májszövetben nem figyeltük meg. Ugyan természetesen nem állt rendelkezésre fertőzés előtti és fertőzés utáni minta, azonban a nem fertőzött májszövetet, biopsziás mintákat összevetve fertőzött egyéntől származó biopsziás mintákkal, lényeges különbséget nem észleltünk.

3.4. Az adhézións molekulák közül kiemelten a claudinokkal, mint a sejtkapcsoló struktúrák

(tight junction – TJ) legfőbb protein komponensével foglalkoztunk. Ezen munkánk legfőbb

célja annak vizsgálata volt, hogy vírusfertőzés, illetve a progrediáló májbetegség, beleértve a már kialakult daganatokat, mennyiben függ össze a sejtek közti kapcsolatok megváltozásával, hiszen a májsejt disszociáció igen fontos tényező a krónikus májbetegségek pathomechanizmusában. A 24 claudin típus közül az 1-, 2-, 3-, 4-, 7-, 8-, 10-, 14-, 15-ös típust vizsgáltuk májszövetben. Az immunhisztokémia során megfelelő specifikus antitesteket alkalmaztunk fagyasztott, illetve paraffinos anyagon. RNS-t izoláltunk fagyasztott, illetve paraffinba ágyazott anyagból, illetve szükség esetén a protein expressziót Western blot analízissel vizsgáltuk. Real-Time PCR-rel határoztuk meg az RNS expresszió mértékét.

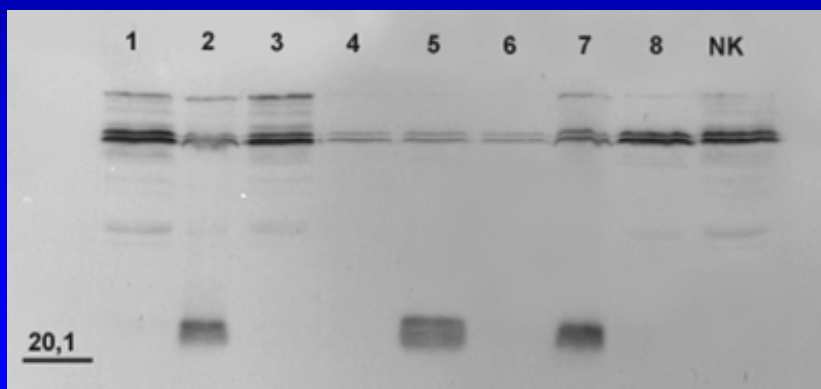
Vizsgálataink során elsősorban a HCV és hepatocarcinogenesis közti összefüggésre, illetve a hepatocellularis carcinoma és egyéb primer májdaganatok, különösen az epeúti daganatokkal való különbözőségekre koncentráltunk.

Vizsgálataink, melyek egy része már közlésre került (lásd: irodalomjegyzék), más részének közlése folyamatban van, a következő megállapításokra vezettek:

- 3.4.1. A normál májsejtek claudin expresszióját alapvetően a claudin-1, -2, és -7 jellemzi. HCV fertőzésben a claudin-1 expresszió kifejezetten csökken. Ez lényeges abból a szempontból, hogy a vírusfertőzés hatására bekövetkező sejtek közti disszociációra hívja fel a figyelmet.
- 3.4.2. A hepatocitákkal szemben az epeút hámsejteket a claudin-4 expresszió jellemzi. Az epeutakból kiinduló daganatokban a claudin-4 erősen expresszálódik, és ez a hepatocellularis carcinomák és cholangiocellularis carcinomák differenciálására felhasználható (5. ábra).

Western immunoblot analízis.

Claudin 4 expresszió cholangiocellularis cc-ban (2,5,7), hepatocellularis cc-ban (1,4), ép (3,6,8) viszonyítva

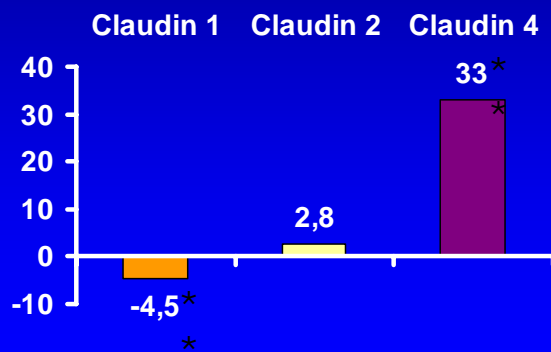


5. ábra

- 3.4.3. A claudin rajzolat oly mértékben jellegzetes a májszövetre, valamint a hepatocitákból kiinduló daganatokra, hogy ennek alapján elkülöníthetők a metasztatikus daganatok többsége a hepatocellularis eredetű tumoroktól (6. ábra).

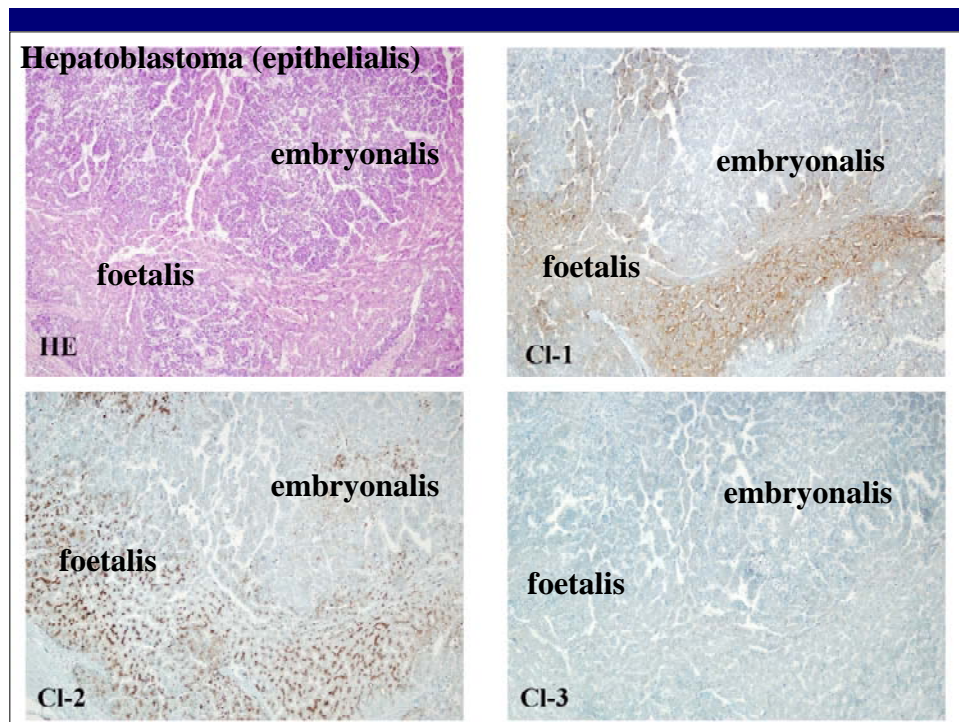
Eredmények 1.

HCC-Metasztázis



6. ábra

3.4.4. A claudin-1 erősen expresszálódik mind fehérje, mind mRNS szinten a hepatoblastomák fetális komponensében, szemben az embrionális sejtekkel. Mindez segít a két komponens arányának exakt meghatározásában, mely prognosztikus jelentőségű (7. ábra).



7. ábra

3.5. Egyes extracellularis matrix komponensek, kiemelten a matrilin-2 és agrin vizsgálata májbetegségekben

Az extracellularis matrix komponensek közül a matrilin újonnan leírt proteín, mely a basalmembrán egyik fontos összetevője. Mivel a májbetegségek progresszióját különösen a cirrhosis, valamint a májdaganatokat a parenhíma sejtek és extracellularis matrix alapvetően befolyásolja, ezért vizsgálatainkban kiemelten vizsgáltuk a matrilin-2 megjelenését. Ezen munkákat a szegedi munkacsoporttal (Deák Ferenc és munkatársai, MTA Szegedi Biológiai Központ) kollaborációban vizsgáltuk, azaz tőlük nyertük az ellenanyagot, illetve a technikák beállításában is segítségünkre voltak.

A következő megállapítások születtek:

- 3.5.1. Normál májban a matrilin-2 csak a portális területeken, az epeutak környezetében és igen gyengén expresszálódik.
- 3.5.2. Májkárosodást követően, kísérletes anyagban a proliferáló őssejtek körül igen kifejezett a matrilin-2 expresszió, melyet in situ hibridizációs vizsgálatok alapján az őssejtek termelnek.
- 3.5.3. Normál májban a sinusoidok mentén matrilin-2 nem található. Cirrhosisban a sinusoidok kapillarizációjának folyamatában a matrilin-2 a lamininnal kolokalizálódva megjelenik a sinusoidok mentén.
- 3.5.4. A hepatocellularis carcinomák ereiben igen nagy mértékű a matrilin-2 expresszió, szemben a normális májszövettel.
- 3.5.5. Az agrin expressziót vizsgálva (melyet az I. sz. Patológiai Intézettel, Kovalszky doktornő munkacsoportjával együtt vizsgáltuk), a kísérletes vizsgálatokat emberi anyagokra terjesztettük ki. A vizsgálatok egyértelműen azt mutatják, hogy a cholangiocellularis carcinomákban jelentősen megnövekszik az agrin mennyisége, ezt követi a hepatocellularis carcinoma, végül legalacsonyabb mértékben a nem daganatos májszövetben figyelhető meg az agrin expresszió.

Összefoglalva vizsgálatainkat:

A legjelentősebb eredménynek a steatosis szerepének vizsgálatát tartjuk a krónikus hepatitis C progressziójában. E mellett a tight junction fehérjei közül a claudinok, mint potenciális markerek felhasználása a legjelentősebb eredmény fenti munkánkból. Úgy tűnik, hogy ezen molekula család egyes tagjai messzemenően jellemzik a különböző sejteket és szöveteket, és változásuk a krónikus folyamatokban, valamint daganatos proliferatio során döntően megváltozik. Különösen fontos azon megállapításunk, hogy ezen molekulák esetleges tumormarkerként is felhasználhatók. A HCV fertőzés szempontjából fontos az a megállapításunk, hogy a HCV fertőzés hatására is megváltozik a claudin expresszió, melynek szerepe lehet a krónikus hepatitisek és egyéb krónikus májbetegségek pathogenezisében.